

小麦全蚀病菌荧光抗体制备方法研究*

刘庆城 许玉兰

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

1970年, Choo, Y. S. 和 Holland, A. A. 首次采用荧光抗体方法对小麦全蚀病菌 (*Gaeummannomyces graminis*, 简称 WTAF) 进行了观察和比较。他们认为, 荧光抗体技术在真菌混合区系的生态研究中, 用以识别和追踪某些真菌是有价值的。^[1-6]

小麦全蚀病是我国粮食作物上重大病害之一, 为了寻找有效的防治办法, 我们利用荧光抗体技术, 对 WTAF 进行识别、定位和追踪, 着重揭示该菌在土壤和小麦根际生态环境中的活动规律。因此, 首先要研究 WTAF 抗血清的制备及其荧光抗体的染色效应。

一、WTAF 三种抗原的制备方法

据前人观察, WTAF 在自然条件下, 主要靠菌丝体生长繁殖, 考虑到在小麦根际中进行识别和追踪的需要, 我们采用其菌丝体作为抗原材料^[7-9], 供试菌种来自山东烟台地区农科所, 制备方法如下:

1. 菌体碎片抗原: 将 WTAF 在液体培养基中 25℃ 下振荡培养 4 天, 收集菌丝体, 用无菌水洗去残余的培养基, 挤去水份, 用 5 倍生理盐水稀释菌丝体, 放入玻璃匀浆器内研磨, 并用超声波处理 5—10 分钟, 再经高速离心 (10,000 转/分) 10 分钟, 保留上清液。沉淀部分加生理盐水继续研磨, 再离心, 重复 3—4 次, 以除去可溶性蛋白质成分。所剩沉淀物加 5 倍生理盐水, 研磨后即成菌体碎片抗原。

2. 菌蛋白抗原的制备: 将制备 WTAF 菌体碎片抗原时的上清液, 用饱和硫酸铵盐析法 (50% 饱和度) 把溶液中蛋白沉淀, 经透析除去铵离子, 把蛋白质含量调至 10—20 毫克/毫升, 即可做为菌蛋白抗原。

3. 全细胞抗原: 菌丝体经滤洗后, 加 5 倍生理盐水, 经研磨与超声波处理, 直接做抗原使用。

二、WTAF 的抗血清及其效价测定

抗原制成后加福氏佐剂, 给家兔脚掌皮下注射, 每周注射一次, 连续 3—4 周, 每次为大剂量多点注射。两个月后测定抗血清效价。

抗血清效价的测定方法为琼脂扩散法: 琼脂经水洗至洁白、透明, 琼脂浓度为 1—1.5%, 琼脂板要厚些 (5—7 毫米), 孔径为 10—12 毫米, 孔与孔之间距离为 5—6 毫米。在平皿中制作琼脂板, 中央孔放混合抗原, 四周孔放不同浓度的抗血清, 置室温下或冰箱中, 每 24 小时观察一次沉淀带形成情况。我们得到三种抗原的抗血清, 其中菌体碎片和菌蛋白抗血清的效价为 1:4—1:8, 全细胞抗血清效价为 1:8—1:16。

三、WTAF 荧光抗体的制备方法

1. 兔抗血清中 γ -球蛋白的分离提纯: 用等体积生理盐水将抗血清稀释, 以 35% 饱和硫酸铵使 γ -球蛋白 (抗体蛋白主要是 γ -球蛋白) 沉淀。弃去上清液, 沉淀部分用生理盐水溶解, 再用 35% 饱和硫酸铵沉淀, 重复 2—3 次, 洗去杂质, 直至沉淀物洁白为止。然后将蛋白质溶液装入火棉胶囊中透析, 去除铵离子, 控制蛋白质溶液的最终体积为原血清体积的 1/2—1/3, 此时溶液的蛋白质含量约为 1—2%。

2. 抗体的荧光染色: 按蛋白质总量的 1/50 加入异硫氰荧光黄, 用碳酸盐缓冲液保持溶液的碱性条件 (pH9—9.5), 在室温下反应 1.5—2 小时。

* 本工作得到北京大学生物系郭振泉老师的热心帮助。

3. 用 G25 型葡聚糖凝胶柱去除未结合的荧光染料: 将标记好的抗体溶液缓缓滴入柱内, 结合后的抗体分子先流出, 而小颗粒的染料分子留于柱的上层。可根据颜色将先流出的黄绿色溶液收集起来, 即为 WTAF 荧光抗体。

四、WTAF 荧光抗体染色效果

1. WTAF 的自体荧光极微弱, 在荧光显微镜下观察, 菌丝虽隐约可见, 但不能使底片感光。荧光抗体染色后, 阳性反应与阴性反应差异明显。而某些镰刀菌的菌丝, 特别是它们的厚垣孢子自体荧光较强, 发出桔红色的光彩, 但仍能与异硫氰酸荧光黄所特有的黄绿色区分开(图 1)。

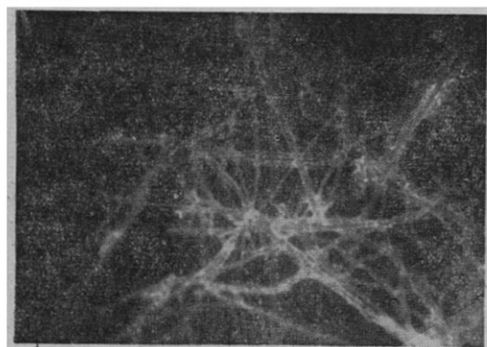


图 1 WTAF 荧光抗体染色阳性反应(450×, 40 秒)

2. 用 WTAF 制成的三种抗原, 以全细胞抗原的抗血清效价最高, 同时在琼脂板内出现两条沉淀带(图 2), 说明全细胞抗原中至少有两种成分存在, 而其他两种抗血清效价较低的

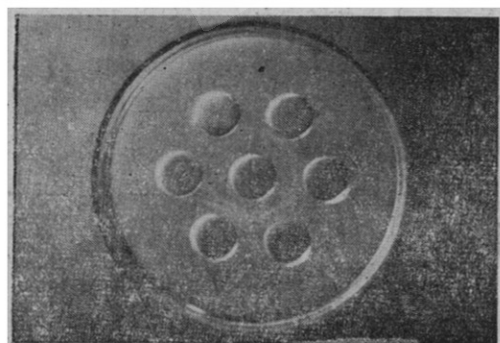


图 2 WTAF 全细胞抗血清的效价表现

抗原, 琼脂板中各自出现一条沉淀带。

3. 用 WTAF 三种成分的荧光抗体分别对 WTAF 的菌丝进行染色, 在荧光显微镜下观察, 发现着色位置都在菌丝的细胞壁上, 而细胞内部未出现着色现象。

4. 用 WTAF 三种成分的荧光抗体分别对抗原菌 WTAF 和一已知的镰刀菌 (*Fusarium solani*) F-015 菌株进行对比染色, 以菌体碎片和全细胞荧光抗体的特异性较好, 无交叉反应或者反应微弱, 而菌蛋白荧光抗体对 F-015 孢子有明显的交叉反应。因此, 我们认为, 真菌蛋白可能是引起交叉反应的重要因素。所以, 在制备真菌荧光抗体时, 要提高其特异性, 减少交叉反应, 应设法除去抗原中的菌蛋白成分。

5. 将 WTAF 全细胞的荧光抗体用二倍法稀释, 不同浓度稀释物在相同条件下对抗原菌 WTAF 进行染色, 在荧光显微镜下观察, 32 倍稀释物仍有较强的亮黄绿色, 而用非抗原菌——F-015 进行对比染色, 稀释 2 倍时, 染色后只有较微弱的自体荧光。这表明我们制成的 WTAF 荧光抗体在荧光强度和特异性方面都有应用价值。

参 考 文 献

- [1] Schmidt, E. L. and R. O. Bancole: *Science*, 136: 776—777, 1962.
- [2] Schmidt, E. L. and R. O. Bancole: *Appl. Microbiol.*, 13: 673—679, 1965.
- [3] Preece, T. F.: *J. Gen. Microbiol.*, 42: V, 1966.
- [4] Goos, R. O. and D. F. Summers: *Mycologia*, 56: 701—707, 1964.
- [5] Marchant, R. and D. G. Smith: *Arch. Microbiol.*, 63: 85—94, 1968.
- [6] Holland, A. A. and Y. Sen. Choo: *Antonie van Leeuwenhoek*, 36: 549—554, 1970.
- [7] Holland, A. A. and Y. Sen. Choo: *Antonie van Leeuwenhoek*, 36: 541—548, 1970.
- [8] 滨岛义博, 免疫组织学, 1975 年。
- [9] 河合忠编辑, 直江史郎执笔: 免疫血清学检验, 1973 年。